



REC'D 23 APR 2004

WIPO

PCT

*Ministero delle Attività Produttive*  
*Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività*  
*Ufficio Italiano Brevetti e Marchi*  
*Ufficio G2*

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N. MI2003 A 000107



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

7 MAR. 2004

IL FUNZIONARIO

*Elena Marinelli*

Sig.ra E. MARINELLI

BEST AVAILABLE COPY

## AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **PRIMM S.r.l.**Residenza **Milano**

codice

09

2) Denominazione

Residenza

codice

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Bianchetti Giuseppe ed altri**denominazione studio di appartenenza **Bianchetti Bracco Minoja s.r.l.**

cod. fiscale

via

**ROSSINI**

n.

8

città

**Milano**

cap

**20122**

(prov)

**MI**

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n.

città

cap

(prov)

## D. TITOLO

**"Peptidi derivati da RANTES"**

classe proposta (sez/cl/sci)

gruppo/sottogruppo

## ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐NO ☒

## E. INVENTORI DESIGNATI

1) **Pavone Vincenzo**

cognome nome

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

2) **Lusso Paolo**

3)

4)

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

1)

2)

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) ☐ **PROV** n. pag. **19**Doc. 2) ☐ **PROV** n. tav. **01**Doc. 3) ☒ **RIS**Doc. 4) ☐ **RIS**Doc. 5) ☐ **RIS**Doc. 6) ☐ **RIS**Doc. 7) ☐

rassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)....

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare).....

lettera d'incarico, procura o riferimento a nota generale.....

designazione inventore.....

documenti di priorità con traduzione in italiano.....

autorizzazione o atto di cessione.....

nominativo completo del richiedente

**centottantotto/51#**

8) attestati di versamento, totale Euro

COMPILATO IL **24 01 2003**

CONTINUA SI/NO

**NO**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

**Banfi Paolo**

obbligatorio

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

**SI**CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI **MILANO**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

**MI2003A 000107**

Reg. A.

L'anno **DUEMILATRE**

Il giorno

**VENTIQUATTRO**

del mese di

**GENNAIO**Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda e corredata da **09** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE **IL RAPPRESENTANTE INFORMATO DEL CONTENUTO DELLA****CIRCOLARE N° 423 DEL 01.03.2001**

LETTERA DEPOSITARIA

M: **CORTONESI**

L'UFFICIALE ROGANTE

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

MI 20003A 0107

REG. A

DATA DI DEPOSITO

24/01/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ / /

## D. TITOLO

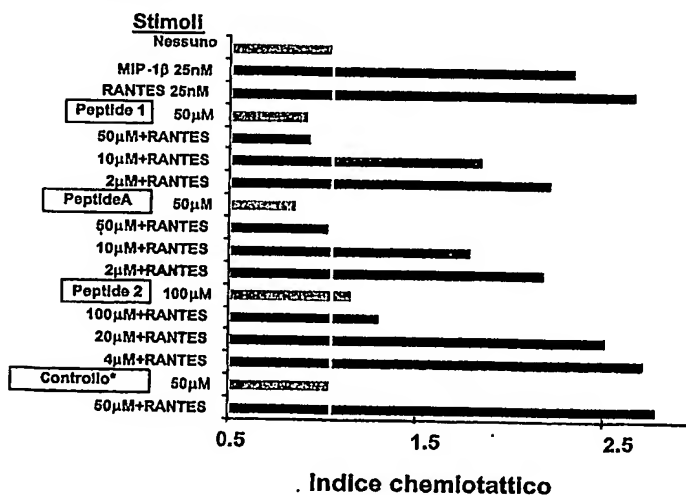
"Peptidi derivati da RANTES"

## L. RIASSUNTO

Si descrivono peptidi derivati da RANTES e il loro impiego nel trattamento di patologie in cui sono coinvolti RANTES e i suoi recettori, quali le malattie virali, in particolare l'AIDS, e patologie infiammatorie, allergiche, degenerative e i tumori.

## M. DISEGNO

Figura. Effetto dei peptidi derivati da RANTES sulla chemiotassi di linfociti primari stimolati con IL-2



\* = Peptide derivato dalla chemochina SDF-1(CXCR4-specifica) con sequenza colineare a quella del peptide 1.



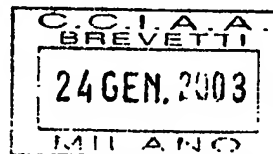
329 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

B/mc **"PEPTIDI DERIVATI DA RANTES"**

MI 2003 A 0 00 1 07

a nome : PRIMM S.r.l.

con sede in : Milano



\* \* \*

La presente invenzione riguarda peptidi derivati dalla chemochina RANTES e il loro impiego nel trattamento di patologie in cui sono coinvolti RANTES e i suoi recettori. Più precisamente l'invenzione riguarda peptidi con sequenze amminoacidiche corrispondenti alle regioni N-loop e  $\beta$ -1 di RANTES, composizioni farmaceutiche che li contengono e il loro uso nella prevenzione o nel trattamento di malattie virali, in particolare l'AIDS, infiammatorie, come l'artrite reumatoide o la sclerosi multipla, allergiche, degenerative, come l'arteriosclerosi, neoplastiche o metastatiche, più in generale di tutte le malattie in cui sono coinvolte le chemochine o i loro recettori.

I peptidi dell'invenzione sono particolarmente utili per il trattamento di patologie associate all'infezione da virus quali l'HIV-1, altri lentivirus dei primati (HIV-2, SIV) e altri virus che utilizzano i recettori per le chemochine per legarsi alla superficie cellulare e/o penetrare nella cellula bersaglio.

#### **Sfondo dell'invenzione**

Il termine chemochine è usato per identificare una famiglia di citochine chemiotattiche caratterizzate da un grado significativo di analogia genetica, strutturale e funzionale (Immunol. Today 1993, 14:24).

La maggior parte delle chemochine note è classificata in due famiglie

principali note con le sigle C-X-C e C-C, a seconda della configurazione di un motivo conservato di due cisteine nella loro sequenza (Ann. Rev. Immunol. 1994, 55:97-179).

Le chemochine sono importanti mediatori delle risposte infiammatorie attraverso il reclutamento di specifiche popolazioni cellulari del sistema immunitario verso il sito dell'infiammazione; le chemochine C-X-C sono generalmente attive sui granulociti neutrofili mentre le chemochine C-C sono attive sui granulociti eosinofili e basofili, sui linfociti e sui monociti.

Alle chemochine C-C appartengono RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  che sono state proposte come possibili mediatori di malattie autoimmuni e allergiche.

È stato descritto per queste tre chemochine uno specifico effetto antivirale nei confronti di lentiretrovirus di primati (Science, 1995, 270:1811-1815).

RANTES è la più potente tra le C-C chemochine che inibiscono l'infezione da HIV. Infatti, questa chemochina si lega al recettore CCR5, che costituisce il principale co-recettore per HIV-1 sulla membrana cellulare, in ~~quale~~ viene utilizzato dalla maggioranza dei ceppi virali presenti nella popolazione e preferenzialmente trasmessi per via sessuale. Tale recettore rappresenta quindi un bersaglio primario per eventuali interventi terapeutici, soprattutto durante la fase asintomatica della malattia da HIV. Tuttavia, uno dei problemi che ostacolano l'eventuale uso delle chemochine in terapia è la loro ~~intrinseca~~ attività pro-infiammatoria, in quanto la maggior parte di esse è coinvolta nel reclutamento dei leucociti nei focolai di infiammazione e di infezione, e nella loro attivazione funzionale.

Numerosi studi condotti negli ultimi anni hanno suggerito che un elemento chiave per l'attivazione del recettore da parte della chemochina si trova all'estremità NH<sub>2</sub>-terminale della molecola (J. Biol. Chem. 1991; 266:23128-23134; Biochem. Biophys. Comm. 1995, 211:100-105). Uno studio preliminare (Nature, 1996, 383:400) ed uno studio più completo (Science; 1997, 276-282) pubblicati di recente hanno infatti dimostrato come analoghi della chemochina RANTES modificati all'estremità NH<sub>2</sub>-terminale (mediante delezione di 8 aa. nel primo studio o legame covalente di un radicale chimico complesso [ammino-ossi-pentano o AOP] nel secondo) mantengano l'attività anti-HIV pur avendo una ridotta od assente capacità di indurre chemiotassi in vitro.

Peptidi corrispondenti alle sequenze di RANTES da 7 a 68 ovvero da 10 a 68 sono descritti in WO97/44462. Mutanti di Rantes privi di attività pro-infiammatoria quali Leu-RANTES e Met-RANTES sono descritti in WO96/17935 e WO98/13495. Tuttavia, in applicazioni di tipo terapeutico, l'utilizzo di piccole molecole o peptidi è preferito, rispetto alla proteina intera, anche se in forma ricombinante, per diverse ragioni, tra cui la facilità di sintesi e la riduzione di effetti collaterali, dovuti a regioni della molecola non utili o addirittura dannose. In letteratura si trovano infatti diversi esempi di peptidi in fase preclinica per la terapia anti-HIV: 1) Judice et al, PNAS 94:13426,1997, dove vengono descritti peptidi strutturalmente rigidi derivati dalla subunità gp41 dell'envelope di HIV, che inibiscono la fusione della membrana cellulare; 2) Prieto et al. AIDS Res Hum Retroviruses 12:1023,1996, dove vengono descritti peptidi modificati (benzyl-conjugated) e derivati da CD4; oppure 3) Robinson et al, J Leuk Biol 63:94, 1998, che

descrive l'attività di Indolicin 13-mer, un peptide naturale di origine bovina, neutrofilo e capace di inibire il virus HIV a dosi comprese tra 60 e 100  $\mu$ M; 4) Heveker et al. Curr Biol 8:369, 1998: che descrive peptidi derivati dall'N-terminus di SDF-1, in grado di bloccare HIV e che, deleti dei primi due amminoacidi, diventano anche privi dell'attività pro-infiammatoria.

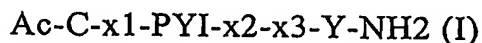
Nella domanda di brevetto WO99/11666 si descrivono derivati di RANTES modificati all'estremità ammino-terminale e il loro impiego come antinfiammatori nel trattamento dell'asma, rinite allergica, dermatite atopica, ateroma/aterosclerosi, artrite reumatoide e come antivirali nel trattamento dell'infezione da HIV.

Nella domanda di brevetto WO98/51705 sono descritti peptidi aventi una sequenza corrispondente al dominio proteico compreso tra la seconda e la terza cisteina di chemochine della famiglia CC, tra cui RANTES, e il loro uso per il trattamento di infezioni da HIV-1 e lentivirus, o per il trattamento di malattie allergiche o autoimmuni.

Nella domanda di brevetto WO00/27880 si descrivono peptidi derivati dalla sequenza 10-34 di RANTES aventi attività inibitoria verso HIV e attività antiallergica e antinfiammatoria.

### **Descrizione dell'invenzione**

Oggetto dell'invenzione sono peptidi derivati da RANTES, di lunghezza variabile da 10 a 19 residui amminoacidici, di formula generale (I) (gli amminoacidi sono indicati con il codice ad una lettera, se non diversamente specificato):



dove Ac- indica un residuo acetile, -NH<sub>2</sub> un terminale carbossamidico,



e x1 e x3, uguali o diversi tra loro sono scelti nel gruppo dei residui idrofobici Phe, Tyr, 1Nal (L-beta-1-naftil-alanina), 2Nal (L-beta-2-naftil-alanina), Cha (L-beta-cicloesil-alanina), x2 rappresenta uno spaziatore contenente da 2 a 12 residui amminoacidi.

Secondo realizzazioni preferite, lo spaziatore x2 è scelto tra 1) la sequenza 16-27 di RANTES (Rif. per sequenza: TJ Schall et al. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. J. Immunol. 141, 1018-1025, 1988), 2) la sequenza 16-27 di RANTES in cui da 1 a 3 residui amminoacidici sono sostituiti con diversi amminoacidi naturali o non naturali, di configurazione L o D, 3) la sequenza 16-27 di RANTES in cui un gruppo qualsiasi di almeno due, preferibilmente almeno tre e non più di nove residui, consecutivi o non consecutivi, è eliminato. Più preferibilmente x2 è scelto tra ARPLPR-X-HIKEYF, ARPLPR-X-HIKEY1Nal, ARPLPR-X-HIKEY2Nal, ARPLPR-X-HIKEYCha, ARPLPR-X-HIF, ARPLPR-X-HYF, ARPLPR-X-EYF, ARPLPRKEYF, ARPLPIKEYF, ARP-X-HIKEYF, dove X rappresenta Ala o Pro.

Rientrano nell'ambito della presente invenzione anche i dimeri dei peptidi di formula (I), ottenibili mediante formazione di un ponte disolfuro tra due residui Cys in posizione 1.

I peptidi dell'invenzione possono essere sintetizzati con varie tecniche note in letteratura, si veda ad esempio Schroeder et al. "The Peptides" vol 1, Academic Press, 1965; Bodanszky et al. "Peptide Synthesis" Interscience Publisher, 1966; Barany & Merrifield, "The peptides; Analysis, Synthesis, Biology", 2, Capitolo 1, Academic Press, 1980. Queste tecniche includono sintesi peptidica in fase solida, sintesi peptidica in soluzione, metodiche sintetiche di chimica organica, oppure una qualunque combinazione di esse.



Lo schema di sintesi prescelto dipenderà naturalmente dalla composizione della particolare molecola. Di preferenza, essendo le molecole rivendicate interamente su base peptidica, sono utilizzate metodiche sintetiche basate su appropriate combinazioni di tecniche in fase solida e di metodi classici in soluzione, che comportano bassi costi produttivi in particolare su scala industriale. Nel dettaglio tali metodiche consistono nella:

i) Sintesi in soluzione di frammenti della catena peptidica attraverso l'accoppiamento successivo di amminoacidi N-protetti, opportunamente attivati, ad un amminoacido o ad una catena peptidica C-protetta, con isolamento degli intermedi, successiva deprotezione selettiva delle estremità N e C-terminali di detti frammenti ed accoppiamento di essi fino all'ottenimento del peptide desiderato. Infine, ove necessario, si deproteggono le catene laterali.

ii) Sintesi in fase solida della catena peptidica dall'estremità C-terminale verso quella N-terminale su di un supporto polimerico insolubile. Il peptide viene rimosso dalla resina per idrolisi con acido fluoridrico anidro o con acido trifluoroacetico in presenza degli opportuni scavengers, con la concomitante deprotezione delle catene laterali.

Sequenze particolarmente preferite sono le seguenti:

Ac-CF	PYI	ARPLPRAHIKEYF	Y	-nh2
Ac-CF	PYI	ARPLPRPHIKEYF	Y	-nh2
Ac-C1Na1PYI		ARPLPRAHIKEYF	Y	-nh2
Ac-C2Na1PYI		ARPLPRAHIKEYF	Y	-nh2
Ac-CCha	PYI	ARPLPRAHIKEYF	Y	-nh2
Ac-CF	PYI	ARPLPRPHIKEY1Na1Y		-nh2

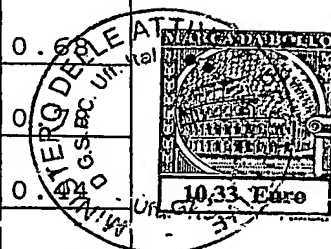
Ac-CF	PYI	ARPLPRPHIKEY2Na1Y	-nh2
Ac-CF	PYI	ARPLPRPHIKEYCha Y	-nh2
Ac-CF	PYI	ARPLPRAHI---F Y	-nh2
Ac-CF	PYI	ARPLPRAH---YF Y	-nh2
Ac-CF	PYI	ARPLPRA---EYF Y	-nh2
Ac-CF	PYI	ARPLPR---KEYF Y	-nh2
Ac-CF	PYI	ARPLP---IKEYF Y	-nh2
Ac-CF	PYI	ARP---AHIKEYF Y	-nh2
Ac-CF	PYI	A---PRAHIKEYF Y	-nh2

I peptidi (I) possono anche essere inseriti in o collegati a sequenze di proteine fisiologiche, quali albumina umana o il frammento Fc  $\gamma$  dell'immunoglobulina IgG umana, che agiscono da carrier non tossico per il dominio antivirale, oppure possono essere legati a molecole di polietilenglicole in modo da ridurre l'immunogenicità, aumentarne la resistenza agli enzimi proteolitici e migliorarne la biodisponibilità. Le tecniche per la preparazione di PEG-derivati sono note nell'arte e sono descritte per esempio in Journal of Biological Chemistry 252(11):3578-3581 (1977), Bioconjugate Chemistry 6:150-165 (1995), US5122614, US5739208.

Alcuni peptidi dell'invenzione sono stati esaminati per verificare la loro attività inibitoria nei confronti del virus HIV-1 e la loro attività chemiotattica. I dettagli delle metodiche sperimentali utilizzate sono riportati negli Esempi. I risultati dei saggi di chemiotassi sono illustrati nell'annessa Figura.

I valori di ID<sub>50</sub> (media di tre esperimenti indipendenti, espressi come valori micromolari) ottenuti con il saggio di inibizione di HIV-1 sono riportati nella Tabella 1:

Pept.	Sequence	MW (uma)	ID <sub>50</sub> (μM)
1	Ac-CF AYI ARPLPRAHIKEYF Y -nh2	4852	2.5
2	2HN-CF PYI ARPLPRAHIKEYF Y -nh2	4768	6.0
3	Rantes (des 1-8)		0.2
A	Ac-CF PYI ARPLPRAHIKEYF Y -nh2	4852	0.5
B	Ac-CF PYI ARPLPRPHIKEYF Y -nh2	4902	0.6
C	Ac-C1NaIPYI ARPLPRAHIKEYF Y -nh2	5000	1.5
D	Ac-C2NaIPYI ARPLPRAHIKEYF Y -nh2	5000	1.7
E	Ac-CCha PYI ARPLPRAHIKEYF Y -nh2	4916	0.9
F	Ac-CF PYI ARPLPRPHIKEY1NaLY -nh2	5004	0.44
G	Ac-CF PYI ARPLPRPHIKEY2NaLY -nh2	5004	0.88
H	Ac-CF PYI ARPLPRPHIKEYCha Y -nh2	4916	0.51
I	Ac-CF PYI ARPLPRAHI---F Y -nh2	4012	1.9
L	Ac-CF PYI ARPLPRAH---YF Y -nh2	4112	0.87
M	Ac-CF PYI ARPLPRA---EYF Y -nh2	4096	0.6
N	Ac-CF PYI ARPLPR---KEYF Y -nh2	4210	0.4
O	Ac-CF PYI ARPLP---IKEYF Y -nh2	4124	0.4
P	Ac-CF PYI ARP---AHIKEYF Y -nh2	4120	0.63
Q	Ac-CF PYI A---PRAHIKEYF Y -nh2	4120	1.9



Come si può vedere dalla Tabella 1, i peptidi secondo l'invenzione (A-Q) mostrano un'attività biologica maggiore o paragonabile, di quella dei due peptidi di riferimento, rappresentati da Ac-RANTES<sub>11-29</sub> e RANTES<sub>11-29</sub> (rispettivamente peptidi 1 e 2 in Tabella 1). Pur mostrando un'attività biologica leggermente inferiore rispetto al capostipite della serie rappresentato da Rantes (des1-9) (peptide 3), i peptidi secondo l'invenzione (A-Q) possono essere ottenuti, a differenza di Rantes (des 1-9), per via sintetica su scala industriale a bassi costi di produzione. Nel complesso i dati raccolti dimostrano l'importanza delle seguenti caratteristiche strutturali per i peptidi dell'invenzione:

- presenza del raggruppamento iniziale C-x1-PYI e dei residui terminali x3-Y e possibilità di variare la regione "linker" nel numero e tipo di amminoacidi;

- sostituzione, rispetto alla molecola naturale di RANTES e di Rantes (des1-9), dell'alanina in posizione 13 in proina (corrispondente alla posizione 3 nei peptidi A-Q). Questa sostituzione abbassa di circa un ordine di grandezza la concentrazione attiva ai 50% del peptide, che passa da circa 2.5 µg/ml a circa 0.4 µg/ml in un test di fusione HIV-mediata, mantenendo l'attività inibitoria della chemiotassi linfocitaria indotta da RANTES a dosi analoghe a quelle efficaci contro HIV.

- acetilazione del primo residuo (Cys).

- Si è inoltre osservato sorprendentemente che i peptidi (I) in forma dimerica esercitano un'azione anti-HIV maggiore rispetto ai loro omologhi monomerici.

I peptidi dell'invenzione sono risultati incapaci di indurre attivazione

del recettore CCR-5 e non sono pertanto in grado di indurre effetti pro-infiammatori tossici.

I peptidi dell'invenzione o i loro derivati, in particolare i dimeri, possono essere utilizzati nella terapia o profilassi dell'AIDS e delle altre patologie associate all'infezione da parte di lentivirus dei primati, ovvero di altri virus che utilizzino recettori per le chemochine come recettori di membrana. Inoltre possono essere utilizzati per il trattamento di malattie allergiche, autoimmuni, dei tumori – circa il ruolo delle chemochine nei tumori e metastasi, si veda Payne AS et al., J Invest Dermatol 2002 Jun; 118(6):915-22 - o di ogni altra patologia in cui le chemochine siano coinvolte nella patogenesi e nelle manifestazioni cliniche. Allo scopo, saranno somministrati opportunamente formulati in composizioni farmaceutiche secondo quanto descritto ad esempio in "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", Mack Publishing Company, New York, U.S.A..

Le composizioni secondo l'invenzione conterranno una quantità efficace dei peptidi (o loro derivati, dimeri), per esempio da 0,1 a 100 mg e saranno somministrate preferibilmente per via parenterale, in particolare per via sottocutanea o intramuscolare. Il dosaggio giornaliero dipenderà ovviamente da più fattori, quali gravità della patologia, peso, sesso ed età del ~~malato~~ <sup>malato</sup> e sarà scelto di volta in volta sulla base degli studi tossicologici, farmacocinetici e farmacodinamici di ogni singolo peptide o derivato. In linea di massima, il dosaggio giornaliero di peptide potrà comunque essere ~~compreso~~ <sup>compreso</sup> tra 10 e 1500  $\mu\text{mol/kg}$  di peso corporeo e il trattamento potrà essere continuato anche per lunghi periodi. Sono anche possibili altre vie di somministrazione, ad esempio quella orale, ricorrendo alla formulazione dei

peptidi in liposomi o altre tecniche note per la somministrazione di peptidi o proteine per via gastroenterica, quali quelle descritte in WO93/25583.

### Esempio 1

Sintesi del peptide Ac-Cys-Phe-Pro-Tyr-Ile-Ala-Arg-Pro-Leu-Pro-Arg-Ala-His-Ile-Lys-Glu-Tyr-Phe-Tyr- NH<sub>2</sub>.

Questo composto è stato sintetizzato mediante la strategia di sintesi peptidica in fase solida. In particolare è stata utilizzata la metodologia che impiega quale gruppo protettore della funzione  $\alpha$ -amminica il gruppo Fmoc. Inoltre tale sintesi è stata condotta utilizzando un sintetizzatore di peptidi automatico, che opera in flusso continuo. La sintesi è stata condotta utilizzando un supporto solido che consente di ottenere il peptide come C-terminale ammide. È stata utilizzata una scala di sintesi di 0,2 mmol, usando una sostituzione della resina pari a 0,50 mmol/g. Per la rimozione del gruppo Fmoc dalla funzione  $\alpha$ -amminica di ogni residuo, dopo l'accoppiamento, è stata utilizzata una soluzione al 20% in volume di piperidina in DMF. Due trattamenti successivi di 3 e 7 minuti, rispettivamente, sono stati utilizzati per ogni ciclo. Gli aminoacidi sono stati inseriti in stadi successivi, e le condizioni e le metodologie impiegate per ogni singolo residuo sono quelle comunemente adoperate in questo tipo di sintesi.

Al termine della sintesi l'estremità N-terminale è stata acetilata per trattamento con una soluzione al 20% in volume di anidride acetica in DMF. Sono stati impiegati 10 ml di tale soluzione ed il trattamento è stato condotto per 20 minuti. Il distacco del peptide dalla resina e la contemporanea rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali è stata effettuata impiegando una miscela di etanditiolo/anisolo/TFA nel rapporto 0,25/ 0,25/

9,5 (in volume) a 0°C per 2 h. La resina è stata filtrata, ed il peptide grezzo è stato precipitato dalla soluzione acida con etere etilico. 0,204 g di prodotto grezzo sono stati ottenuti sotto forma di polvere. È stata ottenuta una resa del 42%, basata sul livello di sostituzione della resina. L'omogeneità del prodotto è stata ricavata dall'analisi mediante HPLC analitico, che ha mostrato la presenza di un singolo picco principale ad un  $t_r = 2,747$  min. Il materiale grezzo è stato purificato mediante RP-HPLC preparativo. Sono stati ottenuti 0,038 g di prodotto puro. L'analisi mediante HPLC analitico ha confermato la purezza del prodotto. L'identità del prodotto è stata confermata mediante spettrometria di massa MALDI-TOF, che ha confermato l'atteso peso molecolare di 2426 uma.

La forma dimerica è stata preparata con la seguente procedura. 10 mg della forma monomerica liofilizzata, sono stati disciolti con 2 ml di una soluzione acquosa al 50% di dimetil solfossido a pH 5-6 (con ammonio bicarbonato al 10%) e tenuti sotto agitazione per 12 ore. La formazione del dimero risulta quantitativa. Mediante HPLC analitica in fase inversa si osserva la comparsa di un componente a tempo di ritenzione più alto e la scomparsa del componente a tempo di ritenzione più basso (colonna Phenomenex Jupiter 5  $\mu$  C18 300A, 150x4,60 mm, 1.2 ml/min, con un gradiente di 8 min dal 42% all'80% di acetonitrile acquoso contenente 0.1% di TFA). In queste condizioni sperimentali, il tempo di ritenzione della forma ridotta di partenza è di 2.747 min e della forma ossidata ottenuta è di 4.340 min. La miscela di reazione è diluita con 4 volumi di acqua, tamponata con acido fosforico (concentrazione finale di 50 mM) e purificata mediante HPLC semi-preparativa. l'identità del prodotto è stata confermata mediante spettrometria di massa MALDI-Tof, che



ha confermato l'atteso peso molecolare di 4847,6 uma.

## Esempio 2

Sintesi dei peptici dimerici:

Ac-CFPYIARPLPRAHIKEYFY-nh<sub>2</sub>, in cui

x<sub>1</sub>=F, x<sub>2</sub>=ARPLPRAHIKEY, x<sub>3</sub>=F

Ac-CFPYIARPLPRPHIKEYFY-nh<sub>2</sub>, in cui

x<sub>1</sub>=F, x<sub>2</sub>=ARPLPRPHIKEY, x<sub>3</sub>=F

Ac-C1NaIPYIARPLPRAHIKEYFY-nh<sub>2</sub>, in cui

x<sub>1</sub>=1NaI, x<sub>2</sub>=ARPLPRAHIKEY, x<sub>3</sub>=F

Ac-C2NaIPYIARPLPRAHIKEYFY-nh<sub>2</sub>, in cui

x<sub>1</sub>=2NaI, x<sub>2</sub>=ARPLPRAHIKEY, x<sub>3</sub>=F

Ac-CChaPYIARPLPRAHIKEYFY-nh<sub>2</sub>, in cui

x<sub>1</sub>=Cha, x<sub>2</sub>=ARPLPRAHIKEY, x<sub>3</sub>=F

Ac-CFPYIARPLPRPHIKEY1NaIY-nh<sub>2</sub>, in cui

x<sub>1</sub>=F, x<sub>2</sub>=ARPLPRPHIKEY, x<sub>3</sub>=1NaI

Ac-CFPYIARPLPRPHIKEY2NaIY-nh<sub>2</sub>, in cui

x<sub>1</sub>=F, x<sub>2</sub>=ARPLPRPHIKEY, x<sub>3</sub>=2NaI

Ac-CFPYIARPLPRPHIKEYChaY-nh<sub>2</sub>, in cui

x<sub>1</sub>=F, x<sub>2</sub>=ARPLPRPHIKEY, x<sub>3</sub>=Cha

Ac-CFPYIARPLPRAHIFY-nh<sub>2</sub>, in cui x<sub>1</sub>=F, x<sub>2</sub>=ARPLPRAHI, x<sub>3</sub>=F

Ac-CFPYIARPLPRAHYFY-nh<sub>2</sub>, in cui x<sub>1</sub>=F, x<sub>2</sub>=ARPLPRAHY, x<sub>3</sub>=F

Ac-CFPYIARPLPRAEYFY-nh<sub>2</sub>, in cui x<sub>1</sub>=F, x<sub>2</sub>=ARPLPRAEY, x<sub>3</sub>=F

Ac-CFPYIARPLPRKEYFY-nh<sub>2</sub>, in cui x<sub>1</sub>=F, x<sub>2</sub>=ARPLPRKEY, x<sub>3</sub>=F

Ac-CFPYIARPLPIKEYFY-nh<sub>2</sub>, in cui x<sub>1</sub>=F, x<sub>2</sub>=ARPLPIKEY, x<sub>3</sub>=F

Ac-CFPYIARPAHIKEYFY-nh<sub>2</sub>, in cui x<sub>1</sub>=F, x<sub>2</sub>=ARPAHIKEY, x<sub>3</sub>=F



Ac-CFPYIAPRAHIKEYFY-nh2, in cui x1=F, x2=APRAHIKEY, x3=F

I peptidi descritti in questo esempio sono stati sintetizzati con una procedura simile a quella riportata nell'esempio 1. Le caratteristiche analitiche sono riportate nella Tabella 2:

composto	Rt	Mw
Ac-CFPYIARPLPRPHIKEYFY-nh2	(1) 4.10	4900
Ac-C1NalPYIARPLPRAHIKEYFY-nh2	(1) 5.70	4998
Ac-C2NalPYIARPLPRAHIKEYFY-nh2	(1) 5.87	4998
Ac-CChaPYIARPLPRAHIKEYFY-nh2	(1) 5.22	4914
Ac-CFPYIARPLPRPHIKEY1NalY-nh2	(2) 9.35	4972
Ac-CFPYIARPLPRPHIKEY2NalY-nh2	(2) 9.62	4972
Ac-CFPYIARPLPRPHIKEYChaY-nh2	(2) 8.74	4884
Ac-CFPYIARPLPRAHIFY-nh2	(2) 9.19	4007
Ac-CFPYIARPLPRAHYFY-nh2	(2) 8.97	4107
Ac-CFPYIARPLPRAEYFY-nh2	(2) 8.30	4091
Ac-CFPYIARPLPRKEYFY-nh2	(2) 8.73	4204
Ac-CFPYIARPLPIKEYFY-nh2	(2) 9.26	4121
Ac-CFPYIARPAHIKEYFY-nh2	(2) 8.54	4115
Ac-CFPYIAPRAHIKEYFY-nh2	(2) 8.71	4115

Le condizioni di analisi mediante HPLC in fase inversa sono: Rt (1) Phenomenex Jupiter 5 $\mu$  C18 300A, 150x4.60 mm 5 $\mu$ , 1.2 ml/min, gradiente di 6 min dal 42% Acetonitrile acquoso, 0.1% acido trifluoroacetico all'80% Acetonitrile acquoso, 0.1% Tfa; Rt (2) gradiente di 10 min dal 26% all'80% ACN-acq. 0.1% Tfa.

Le masse molecolari (Mw) sono state determinate mediante

spettrometria di massa MALDI-ToF.

### **Esempio 3**

#### **Saggio d'inibizione di HIV-1**

Per il saggio di fusione cellulare mediato da HIV-1 è stato utilizzato un test originariamente sviluppato da Berger e collaboratori, basato sulla tecnologia del virus vaccinia ricombinante, con alcune modifiche. Nel saggio modificato, alti livelli di espressione dell'involucro di HIV-1 sulle cellule effettrici sono ottenuti attraverso infezione cronica di una linea cellulare sensibile con HIV-1 piuttosto che attraverso virus vaccinia ricombinanti esprimenti il gene dell'involucro. In breve, cellule effettrici (PM1<sub>Bal</sub> o Molt-3<sub>IIB</sub>) sono state infettate con vTF-7.3 vaccinia ricombinante, codificante l'RNA polimerasi del batteriofago T7; in parallelo, cellule bersaglio (PM1 o Molt-3 non infette) sono state infettate con vCB-21R vaccinia ricombinante, contenente il gene LacZ di E. Coli legato al promotore T7. La molteplicità d'infezione era di 10 per ciascun vaccino ricombinante. Cellule infettate da vaccinia sono state risospese a  $5 \times 10^5$  cellule/ml in terreno di Eagle modificato addizionato con FBS 2,5% (MEM-2.5) e incubate per una notte a 32°C. A 18 ore dall'infezione con virus vaccinia, le cellule sono state lavate e risospese in MEM-2.5 per il saggio di fusione. Cellule effettrici e cellule bersaglio (ciascuna a  $1 \times 10^5$  cellule/ml) sono state mischiate in piastre da 96 pozzetti e incubate per 2 ore a 3°C; quindi le cellule sono state lisate per aggiunta di NP-40 (0,5% finale) e l'attività  $\beta$ -galattosidasi è stata quantificata nei lisati mediante saggio enzimatico.

#### **Saggio di chemiotassi linfocitaria**

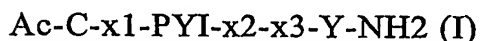
L'attività chemiotattica di chemochine e peptidi è stata saggiata in camere

TranswellTM da 24 pozzetti, usando membrane con filtro di policarbonato con pori da  $5\mu\text{m}$  (Costar). I linfociti umani sono stati derivati da PBMC ottenute da donatori sani per coltura in terreno RPMI addizionato di siero fetale bovino al 10% in presenza di interleuchina-2 (100U/ml), senza precedente attivazione mitogenica in vitro. L'espressione di CCR5 è stata monitorata a intervalli di 2 giorni e le cellule sono state analizzate per chemiotassi tra i giorni 7 e 14, quando il livello di CCR5 era alto per quasi la totalità delle cellule. Per testare l'attività agonista, le chemochine o i peptidi sono stati diluiti in terreno RPMI contenente 0,3% di albumina di siero umano e aggiunti alla camera inferiore in un volume totale di 500ml; un totale di  $1,5 \times 10^5$  cellule in 250 ml di terreno completo è stato aggiunto alla camera superiore. Per testare l'attività antagonista, i peptidi sono stati miscelati alle cellule prima dell'aggiunta alla camera superiore. Dopo incubazione di 2 ore a  $37^\circ\text{C}$ , le camere superiori sono state rimosse, il loro fondo è stato accuratamente lavato e il numero di cellule migrate nella camera inferiore è stato determinato con un analizzatore FacScan a una velocità di flusso fissa di 0,001/min per 40 sec. Sono state utilizzate "gates" idonee per escludere le cellule morte. L'indice chemiotattico è stato calcolato come rapporto tra il numero di cellule migrate in presenza di stimoli e quelle spontaneamente migrate in assenza di fattori esogeni.



## RIVENDICAZIONI

1. Peptidi derivati da RANTES contenenti da 10 a 19 amminoacidi, di formula (I):



dove Ac- indica un residuo acetile, -NH<sub>2</sub> un terminale carbossamidico, e x1 e x3, uguali o diversi tra loro sono scelti nel gruppo dei residui idrofobici Phe, 1Nal, 2Nal, Cha, x2 rappresenta uno spaziatore contenente da 2 a 12 residui amminoacidi.

2. Peptidi secondo la rivendicazione 1, dove x2 è scelto tra 1) la sequenza 16-27 di RANTES, 2) la sequenza 16-27 di RANTES in cui da 1 a 3 residui amminoacidici sono sostituiti con diversi amminoacidi naturali o non naturali, di configurazione L o D, 3) la sequenza 16-27 di RANTES in cui un gruppo di almeno due, preferibilmente almeno tre e non più di nove residui, consecutivi o non consecutivi, è eliminato.

3. Peptidi secondo la rivendicazione 1, in cui x2 è scelto tra ARPLPR-X-HIKEYF, ARPLPR-X-HIKEY1Nal, ARPLPR-X-HIKEY2Nal, ARPLPR-X-HIKEYCha, ARPLPR-X-HIF, ARPLPR-X-HYF, ARPLPR-X-EYF, ARPLPRKEYF, ARPLPIKEYF, ARP-X-HIKEYF, dove X rappresenta Ala o Pro.

4. Dimeri dei peptidi (I) in cui due qualsiasi di detti peptidi sono uniti da un ponte disolfuro tra i due residui Cys in posizione 1.

5. Composizioni farmaceutiche contenenti come principio attivo un peptide (I) o un suo dimero secondo le rivendicazioni precedenti.

6. Composizioni farmaceutiche secondo la rivendicazione 5, per uso nel trattamento di patologie in cui è coinvolto il recettore di RANTES.

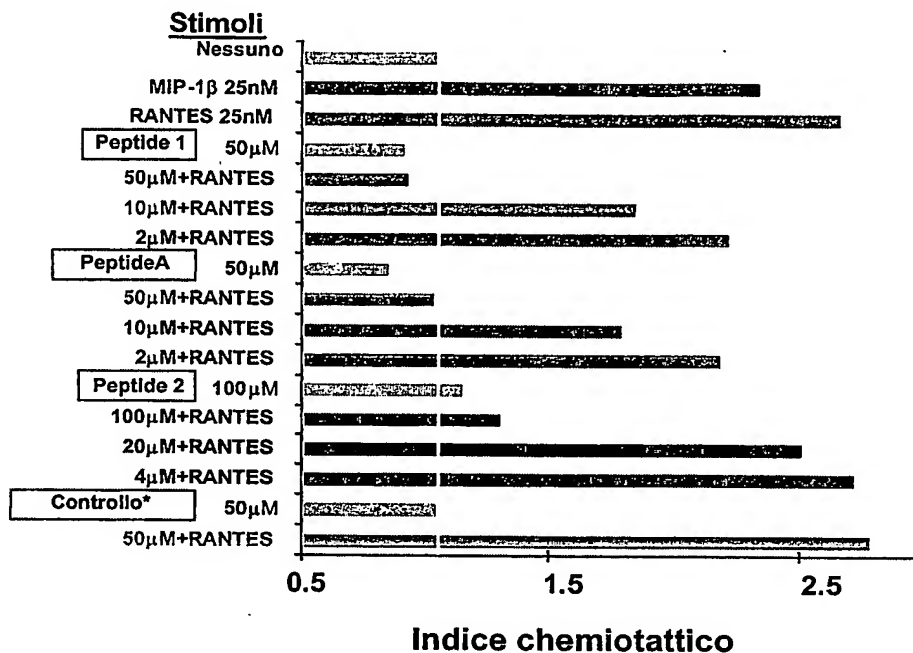
7. Uso dei peptidi (I) o dei loro dimeri secondo le rivendicazioni 1-4 per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento di infezioni virali, in particolare da HIV, delle malattie infiammatorie, allergiche, degenerative e neoplastiche o metastatiche.

Milano, 24 gennaio 2003

Il Mandatario  
(Banfi Paolo)  
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.



**Figura. Effetto dei peptidi derivati da RANTES sulla chemiotassi di linfociti primari stimolati con IL-2**



\* = Peptide derivato dalla chemochina SDF-1(CXCR4-specifica) con sequenza colineare a quella del peptide 1.

MI 2003 A 0 00 1 07

Il Mandatario  
(Banfi Paolo)  
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

*Handwritten signature of Paolo Banfi*



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**